

# 免耕水稻土壤中细菌多样性及其空间分布的研究\*

王英<sup>1,2</sup> 滕齐辉<sup>1</sup> 崔中利<sup>1</sup> 孙波<sup>3</sup> 曹慧<sup>1†</sup> 胡锋<sup>2</sup>

(1 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室,南京 210095)

(2 南京农业大学资源与环境科学学院,南京 210095)

(3 中国科学院南京土壤研究所,南京 210008)

**摘要** 采用基因指纹图谱 ARDRA 分析和 RFLP 分析,对免耕水稻土壤中的细菌多样性及其在 0~5、5~10、10~15 cm 土层的空间分布进行了研究。结果表明:在不同层的水稻土壤环境中,细菌种类非常丰富,但由于其多样性受土壤水分或土壤层次等多种因子的影响,在不同层土壤环境中其多样性存在差异。表层土壤环境中细菌种类最丰富,多样性最高,且基因型中无明显的优势类群。10~15 cm 土层的细菌种类相比之下最少,且基因型中有相对的优势类群。不同层的土壤环境间细菌群落的相似性较低,表层土壤的细菌克隆文库与 5~10 cm 的文库的 Jaccard 指数是 20.65%,与 10~15 cm 的文库的 Jaccard 指数仅为 8.31%。5~10 cm 的文库与 10~15 cm 的文库的 Jaccard 指数为 38.75%。表明细菌群落结构以及土壤空间隔离的复杂性。

**关键词** ARDRA;RFLP;水稻土;细菌群落;微生物多样性;空间分布;免耕

**中图分类号** S154.34;Q938.1

**文献标识码** A

我国是水稻 (*Oryza sativa* L.) 起源地之一,水稻作为最重要的粮食作物,一直被放在优先发展的位置上,其播种面积和总产量分别占全国粮食作物的 30% 和 45%。在新的历史条件下,为了提高市场竞争力和适应消费者挑剔性选择的需要,水稻栽培方式开始向低成本、优质、高效方向转变,如何在稳定产量或略有减产的前提下,大幅度降低生产成本、提高生产效益便成为一个迫切需要研究的新课题。在此形势下,水稻的免耕栽培技术日益受到人们的重视,免耕 (Non-tillage, NT) 又称零耕 (Zero-tillage),是土壤不进行翻耕,而直接进行播栽的一种耕作方法,与常规的翻耕比较,具有省工、省时、高效和保持水土的优点。

近年来,水稻免耕技术发展很快,在研究和应用推广方面都取得了一定的进展<sup>[1~3]</sup>。对免耕的经济效益以及对土壤的结构和理化性质的影响也做了不少的报道<sup>[4~9]</sup>。但是对免耕水稻田的微生物及其在土壤空间分布的特点还很少有人去研究,而土壤微生物在植物枯枝分解、养分循环、土壤结构、氮的固定、减少植物病原体和土壤形成、发育、土壤结构和肥力保持以及高

等植物生长方面也起着重要的作用<sup>[10]</sup>。所以研究免耕稻田的微生物的多样性及其在土壤空间分布具有重要理论和实践意义。

本研究采用间接提取法从土壤样品中提取微生物总 DNA,通过建立土壤微生物的 16S rDNA 基因文库来分析免耕水稻土壤中的微生物群落结构特征及其多样性,为全面深入了解免耕水稻土壤的微生物多样性,揭示土地利用变化与生态环境效应之间的关系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

从江西省余江县 (N28°15', E116°55') 邓家埠水稻原种厂的淹水免耕的水稻试验田中采取土样。试验田面积为 1 080 m<sup>2</sup>。余江县多年年平均气温为 17.6℃,年均降雨量和蒸发量分别为 1 752 mm 和 1 359 mm。分三层连续取样,每层 5 cm,方式为“S”型,取 30 个点,然后把 30 个点的土样充分混匀。土样取出后,立即放入冷藏盒内,带回实验室。除去根系、石块等杂物,保存在 4℃ 冰箱中。取一部分风干

\* 国家自然科学基金项目 (40371069)、国家 973 项目 (2005CB121108) 和国家 863 现代农业重大专项课题 (2002AA2Z4331) 资助

† 通讯作者, E-mail: Hcao@njau.edu.cn

作者简介:王英 (1978~),女,硕士研究生,主要从事土壤微生物分子生态学研究

收稿日期:2005-10-08;收到修改稿日期:2006-03-03

后测定土壤理化性质。测定项目及方法参见文献[11]:有机质含量用重铬酸钾容量法;全氮量用高锰酸钾-还原性铁修正开氏法;有效氮用碱解扩散法;有效磷用碳酸氢钠法;pH值用电位法;含水量用烘干法。同时取新鲜土样进行三大菌群的平板计数,

方法参照文献[12]。剩下的土壤样品在-20℃储存至其他处理分析的时间不超过2周。

供试土壤属河流冲积土发育而成的潴育型水稻土。土壤微生物平板计数结果如表1。供试土壤的理化性质见表2。

表1 土样中三大菌群数量比较

Table 1 Populations of three major microbial communities in different soil sample

土层 Soil depth (cm)	菌落形成单位 Colony forming units ( $\times 10^6$ cfu $g^{-1}$ dry soil)		
	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	放线菌 Actinomycetes
0~5	428.0	1.51	19.01
5~10	182.0	0.81	8.64
10~15	65.7	0.11	2.06

表2 供试土壤的理化性质

Table 2 Physico-chemical properties of the soil tested

土层 Soil Depth (cm)	有机质含量 Organic matter content ( $g\ kg^{-1}$ )	全氮 Total nitrogen ( $g\ kg^{-1}$ )	有效氮 Available nitrogen ( $mg\ kg^{-1}$ )	有效磷 Available phosphorus ( $mg\ kg^{-1}$ )	pH	含水量 Soil moisture ( $g\ kg^{-1}$ )
0~5	26.9	1.76	96.2	17.2	5.51	269
5~10	25.7	1.67	95.9	16.9	5.52	351
10~15	23.3	1.23	93.3	14.6	5.52	389

## 1.2 菌株、培养基与试剂

*E. coli* DH5 来自于南京农业大学农业部环境微生物工程重点开放实验室;pMD18-T-simple Vector 购自大连宝生物公司(TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co. Ltd);氨苄青霉素(Amp)、丙烯酰胺(acrylamide)、过硫酸铵(Ammonium persulfate)、四甲基乙二胺(TEMED)均购自南京创瑞公司;Taq 酶、X-gel 和 IPTG 购自申能博彩公司;PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成;DNA 回收试剂盒购自 V-gene Biotechnology Limited;培养基配制参照文献[13]。

## 1.3 多态性指纹扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析

**1.3.1 土壤总 DNA 提取与纯化** 采用间接法提取自然土壤总 DNA,具体操作步骤参照文献[14]。采用紫外分光光度法对土壤微生物总 DNA 进行定量。提取的总 DNA 用 0.75% 的琼脂糖凝胶电泳检查提取质量和片段大小。

由于粗 DNA 样品中含有 RNA、蛋白质、糖类以及腐殖质等,会影响 PCR 反应以及其他后续操作,本研究采用 DNA 回收试剂盒进行纯化,操作步骤参照其说明书。

**1.3.2 16S rDNA 的 PCR 扩增** 采用细菌特异性

引物,引物 1 序列为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',(*E. coli* base 8 to 27);引物 2 序列为:5'-TACCTTGTTACGACTT-3',(*E. coli* base 1507 to 1492),直接扩增总 DNA 中的细菌 16S rDNA 片段。扩增体系为:总体积为 25  $\mu$ l,其中包括 2.5  $\mu$ l 的 10  $\times$ buffer,2  $\mu$ l 的  $Mg^{2+}$  (25  $mmol\ L^{-1}$ ),2  $\mu$ l 的 dNTP (2.5  $mmol\ L^{-1}$ ),1  $\mu$ l 的总 DNA 溶液(约 30  $ng\ \mu$ l $^{-1}$ ),引物 1 和引物 2 各 0.5  $\mu$ l (25  $pmol\ L^{-1}$ ),0.3  $\mu$ l 的 Taq 聚合酶,16.2  $\mu$ l 的双蒸水。扩增程序如下:95℃ 预变性 5 min,之后进行 30 个循环(每个循环为:94℃ 变性 30 s,50℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 1 min),然后再 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 0.75% 的琼脂糖电泳,EB 染色后紫外分析仪检测。

**1.3.3 T/A 克隆** 通过 T/A 克隆技术将扩增的 16S rDNA 片段转移至高效感受态细胞 *E. coli* DH5 中,通过蓝-白斑筛选的方法挑取阳性克隆,把携带目标基因 16S rDNA 片段的 *E. coli* 克隆细胞挑到含有 AMP 的 LB 平板上,建立 16S rDNA 克隆文库,然后进行群落分析。具体步骤参照文献[13]。

**1.3.4 转化子插入片段的扩增** 通过菌体 PCR 方法用 pMD 18-Tsimple 载体通用引物 (BcaBEST

Primer 1 RV-M:5'-GAGCGGATAATTCACACAGG-3' 与 BcaBEST Primer 2 M13 - 47:5'-CGCCAGGGTTTCC-CAGTACGA-3') 来扩增阳性克隆子中插入的 16S rDNA 片段,扩增体系如下:总体积为 25  $\mu\text{l}$ ,其中包括 2.5  $\mu\text{l}$  的 10  $\times$ buffer,2  $\mu\text{l}$  的  $\text{Mg}^{2+}$  (25  $\text{mmol L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{l}$  的 dNTP (2.5  $\text{mmol L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{l}$  的 Tween 20(10%),引物 1 和引物 2 各 0.5  $\mu\text{l}$  (25  $\text{pmol L}^{-1}$ ), 0.3  $\mu\text{l}$  的 Taq 聚合酶,15.2  $\mu\text{l}$  的双蒸水,模板是挑取的少量菌体。扩增程序如下:95 预变性 8 min,之后进行 29 个循环(每个循环包括:94 变性 30 s,60 复性 30 s,72 延伸 1 min),然后再 72 延伸 15 min。PCR 产物经 0.75% 的琼脂糖电泳,EB 染色后紫外分析仪检测。

**1.3.5 限制性酶切插入片段的扩增产物** PCR 产物用 *Hha* I 和 *Rsa* I 二种限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切。酶切体系为 10  $\mu\text{l}$ ,其中包括 2  $\mu\text{l}$  PCR 产物,1  $\mu\text{l}$  的 10  $\times$ buffer,0.5  $\mu\text{l}$  限制性内切酶。6.5  $\mu\text{l}$  双蒸水。37  $^{\circ}\text{C}$  水浴酶切 8~10 h。

**1.3.6 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳** 酶切 DNA 片段用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(300 V,3 h)分离,后经 0.1% 硝酸银染色液染色和显色液显色后,再用凝胶成像系统成像。

#### 1.4 限制性酶切片长度多态性分析

所得 DNA 带型图谱在 GIS 凝胶分析软件辅助下用人工进行比较分析。以基因片段多态图像为基础进行聚类,根据不同图像间的相似性将所有的图像聚合成一个聚类树。通过聚类分析而被聚合到一起的具有相同基因图像的克隆再用 *Rsa* I 限制性内切酶水浴消化(37  $^{\circ}\text{C}$ ,8~10 h)。然后把所得 DNA 带型图谱再在 GIS 凝胶分析软件辅助下用人工进行比较分析。当第二次所获得的基因图像仍然相同时,则认为它们是相同的基因型。每一个基因型称为一个操作分类单元(OTU,Operational Taxonomic Unit) 或称为唯一基因型<sup>[15]</sup>。

#### 1.5 数据分析

分析方法见参考文献[16],Shannon-Wiener 指数的计算公式为:

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i \quad P_i = n_i / N$$

式中, $S$  为 16S rDNA 的所有 RFLP 总类型数; $n_i$  为第  $i$  种 16S rDNA 的 RFLP 变异类型克隆数, $N$  为总克隆数。

Simpson 指数的计算公式为:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s P_i^2 \quad P_i = n_i / N$$

式中, $S$  为 16S rDNA 的所有 RFLP 总类型数; $n_i$  为第  $i$  种 16S rDNA 的 RFLP 变异类型克隆数, $N$  为总克隆数。

Geason 和 Margalef 物种丰富度指数的计算公式为:

$$d_{Ma} = \frac{S-1}{\ln N}$$

式中, $S$  为 16S rDNA 的所有 RFLP 总类型数; $N$  为总克隆数。

Evenness 均匀度指数的计算公式为:

$$E = \frac{H}{H_{\max}}$$

式中, $H$  为多样性指数, $H_{\max}$  为最大多样性指数。

Coverage C 文库的库容<sup>[17]</sup>的计算公式为:

$$C = 1 - \frac{nl}{N}$$

式中, $N$  代表 16S rDNA 文库总克隆数, $nl$  代表在文库中仅出现一次的 OTUs (Operational Taxonomic Units) 的数量。

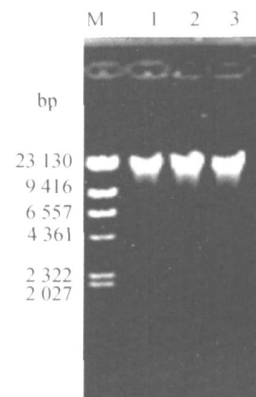
群落相似性采用 Jaccard 指数: $q = c / (a + b - c)$

式中, $a$ 、 $b$  分别为群落 A、B 的类群数, $c$  为二类群的共有的类群数。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 DNA 的提取、16S rDNA 及克隆子插入片段的扩增

本实验中提取的微生物总 DNA 的电泳图谱见



泳道 1 为 0~5 cm 层土壤的总 DNA;泳道 2 为 5~10 cm 层土壤的总 DNA;泳道 3 为 10~15 cm 层土壤的总 DNA;M 为 Hind III Marker

Line 1. DNA extraction from 0~15 cm soil;

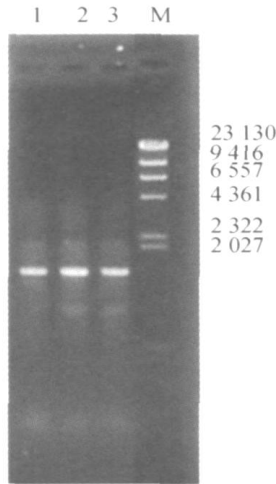
Line 2. DNA extraction from 5~10 cm soil;

Line 3. DNA extraction from 10~15 cm soil;M. Hind III Marker

图 1 间接法提取的土壤微生物总 DNA 的琼脂糖电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total microbial DNA extracted from soil

图 1, 0~5 cm 层土壤总 DNA 提取量为 3.89  $\mu\text{g g}^{-1}$  (干土), 吸光值 A260/A280 为 1.55; 5~10 cm 层土壤总 DNA 提取量为 3.51  $\mu\text{g g}^{-1}$  (干土), 吸光值 A260/A280 为 1.64; 10~15 cm 层总 DNA 提取量为 1.91  $\mu\text{g g}^{-1}$  (干土) 吸光值 A260/A280 为 2.39。从相



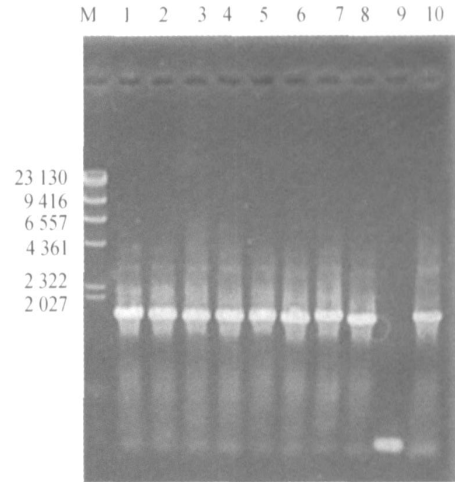
泳道 1 为 0~5 cm 层土壤的 16S rDNA; 泳道 2 为 5~10 cm 层土壤的 16S rDNA; 泳道 3 为 10~15 cm 层土壤的 16S rDNA; M 为 Hind III Marker  
line1. 16S rDNA amplification product from 0~5 cm soil;  
line2. 16S rDNA amplification product from 5~10 cm soil;  
line3. 16S rDNA amplification product from 10~15 cm soil;  
M. Hind III Marker

图 2 16S rDNA 的扩增产物的琼脂糖电泳图谱

Fig. 2 Argarose gel electrophoresis of 16S rDNA

同重量的土壤中提取的总 DNA 的量来看, 上层和中间层的微生物的量明显高于底层土壤中的微生物的量, 这与平板计数的结果相一致。另外, 可能由于表层和中间层存在的植物残体的量高于底层, 使得底层土壤中的总 DNA 的纯度高于表层和中间层土壤的总 DNA。PCR 扩增后 16S rDNA 基因片段大小约为 1500 bp, 用 0.75% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染

色后, 经凝胶成像仪成像后得到图谱如图 2。克隆子的扩增产物片段大小约为 1600 bp, 用 0.75% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后, 经凝胶成像仪成像后得到图谱如图 3。从图 3 可以看出, T/A 克隆的效率达到 90% 以上。



泳道 1~10 为克隆子的扩增产物; M 为 Hind III Marker  
Line 1~10. Clones amplification product; M. Hind III Marker

图 3 克隆子插入片段扩增产物的琼脂糖电泳

Fig. 3 Argarose gel electrophoresis of clone insertion element amplification product

## 2.2 克隆文库的 ARDRA 分析

2.2.1 16S rDNA 克隆文库 HhaI - RsaI 酶酶切类型的多样性 本实验对免耕水稻土不同深度的土壤样品进行了分析和研究, 获得了丰富度极高的土壤细菌的克隆群落。从每层土的 16S rDNA 文库的数千个克隆子中随机挑取了 500 多个克隆子, 经 HhaI 和 RsaI 二种限制性内切酶酶切后, 所得 DNA 带型图谱在 GIS 凝胶分析软件辅助下用人工进行比较分析, 都得到 400 左右的 OTUs, 结果如表 3。

表 3 16S rDNA 克隆文库 HhaI - RsaI 酶酶切类型的多样性

Table 3 Diversity of HhaI - RsaI RFLP phlotypes in 16S rDNA clone library

土层 Soil depth (cm)	操作分类 单元类型 OTUs type	库容值 Coverage C	香农指数 Shannon-Wiener index	辛普森指数 Simpson index	均匀度 Evenness	丰富度 Margalef
0~5	459	21.33 %	6.064	0.997	0.989	73.12
5~10	433	23.31 %	5.936	0.996	0.978	69.18
10~15	372	39.57 %	5.669	0.994	0.957	59.56

通过表 3 可以看出, 表层土壤中的细菌群落的

多样性高于 5~10 cm 层土壤中的细菌群落的多样

性,但差别不明显,二者均明显高于 10~15 cm 层土壤细菌群落的多样性,又即随着土壤深度的增加,细菌多样性越低,且物种均匀度(species evenness)也随着降低。这可能由于随着土壤深度增加,土壤养分结构、水分、温度、通气状况变劣,能适应此环境生存的微生物种群减少,而少数适存者形成种群优势。

理论上,克隆文库的库容值表示 16S rDNA 克隆文库中所包含微生物的种类占样品中全部微生物种类的比例。当库容值为 100% 时可以代表环境样品中的微生物的种类,但最近 Kemp 等<sup>[18]</sup>运用多种统计方法分析比较了文献报道的 225 个来自多种环境的 16S rDNA 的组成,发现随着库容的增大,OTU 的数目总是在增加,这一结果说明几乎没有哪一个文库穷尽了样品中微生物的多样性,很显然 16S rDNA 克隆文库库容值都不能达到 100% (即使不考虑 PCR 的影响<sup>[19]</sup>)。本研究通过间接法提取的土壤总 DNA 建立的 16S rDNA 克隆文库,文库的库容值分别为 21.33%、23.31%、35.89% (见表 3)。数值都

比较小,文库的覆盖程度都很低,这表明库容不足。而生态多样性指数数值都很高(见表 3),丰富度指数分别为 73.12、69.18、59.56,可见土壤中生物多样性信息十分丰富。这说明环境中更多的微生物种类需要人们去分离、认识。

本研究过程中因为工作量和时间的局限,从每个土壤样品中获得的总 DNA 并没有全部被用于克隆,且获得的每个文库的数千个克隆细胞也只是一小部分进行 RFLP 分析。据此可以想象,土壤中细菌种类的数量远远在表 3 所列数值以上。

### 2.2.2 免耕水稻土壤环境中细菌群落的丰度曲线

经过对土壤不同层样品中细菌群落结构的分析与研究,同样发现在不同层的土壤环境中细菌群落结构发生明显的变化。由图 4 的丰度曲线可以看到当土壤层次加深时,细菌群落的多样性逐渐减少,但在细菌群落中出现优势的种群(本文中的优势细菌群落的定义为具有相同 OTU 的克隆子的数量占总克隆数的 1% 以上),并呈逐渐增多的趋势。

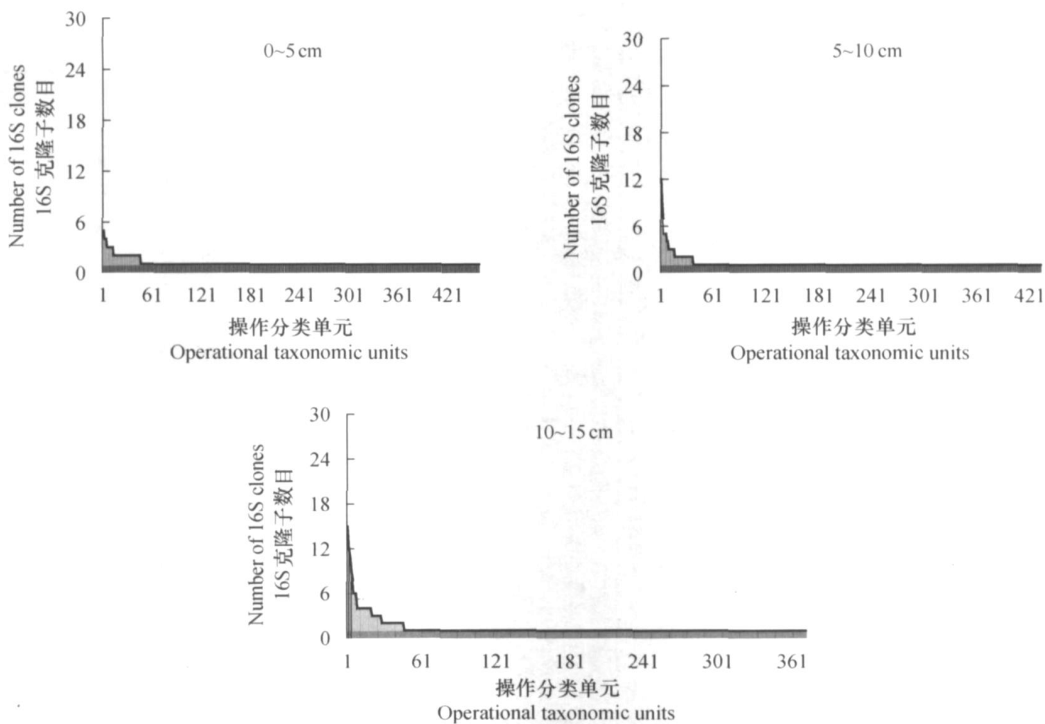


图 4 不同层土壤的细菌群落的丰度曲线图

Fig. 4 Rank abundance curves of bacterial community from different soil layers

### 2.3 免耕水稻土壤中细菌群落结构空间分布的相似性

通过用 Jaccard 指数来比较不同土层细菌群落结构空间分布的相似性。当两个群落间相同的 OTUs 多时,说明群落之间重叠较大,具有较多的相同的种群,群落间相似性高。反之,群落之间的相似性就小。本实验三个文库之间的 Jaccard 指数如下:0~5 cm 层克隆文库与 5~10 cm 层克隆文库的 Jaccard 指数为 20.65%,5~10 cm 层克隆文库与 10~15 cm 层克隆文库的 Jaccard 指数较高,为 38.75%,但 0~5 cm 的克隆文库与底层文库 Jaccard 指数较低,仅为 8.31%。从三个文库之间的 Jaccard 指数可以看出,表层的细菌群落与底层的细菌群落结构相似性较低,这表明,随着土层加深,土壤养分结构、水分、温度、透气状况有个过度变化过程,三个土层的细菌群落结构也相应形成一个过度变化过程。

## 3 结 论

1) 实验数据表明,免耕水稻土中细菌群落多样性非常丰富,从每层的克隆文库中挑取的 500 多个转化子中就有 400 多种酶切类型,尤其是 0~5 cm 层的细菌,525 个克隆子中就有 459 种酶切类型。可见土壤中的细菌群落非常丰富。

2) 从细菌群落在水稻土壤的空间分布差异来看,0~5 cm 土层的细菌群落的多样性高于 5~10 cm 土层的细菌群落的多样性,同时也高于 10~15 cm 土层的细菌群落的多样性。表层与中间层的细菌群落多样性差别不大,但都明显高于底层土壤中细菌群落的多样性。

3) 在表层土壤中,没有优势的细菌群落出现,但随着土壤深度的增加,优势的细菌群落也在增多。

## 参 考 文 献

- [1] 楚良,谢永芬,徐庆坤. 水稻免耕栽培技术在昆明的应用. 云南农业科技, 2005, 1:23~24. Chu L, Xie Y F, Xu Q K. The application of the technology of no-tillage plant in Kunming (In Chinese). Yunnan Agriculture Science and Technology, 2005, 1:23~24
- [2] 何庆富,叶江富,应婉琴. 水稻免耕直播栽培技术探析. 中国稻米, 2001, 3:24~25. He Q F, Ye J F, Ying W Q. The analyses of the technology of rice no-tillage direct seeding (In Chinese). Rice of China, 2001, 3:24~25
- [3] 韦柏林,黄业葵,庞魏,等. 水稻免耕抛秧栽培技术初探. 广西农学报, 2003, 1:12~17. Wei B L, Huang Y K, Pang W, et al. The original analyses of the technology of fling rice seeding and no-tillage growth (In Chinese). Journal of Guangxi Agriculture, 2003, 1:12~17
- [4] 区伟明,陈润珍,黄庆. 水稻免耕抛秧经济效益及生态效益分析. 广东农业科学, 2000, 6:5~6. Ou W M, Chen R Z, Huang Q. The analyses of economic and ecology benefits of rice no-tillage and fling rice seeding (In Chinese). Guangxi Agricultural Science, 2000, 6:5~6
- [5] 张勇勇,顾克章,张顺泉. 水稻免耕旱播耕作法的效益及其对土壤理化性状的影响. 浙江农业科学, 1997, 3:118~120. Zhang Y Y, Gu K Z, Zhang S Q. The benefit of rice no-tillage drought cultivated and its influence on soil physical and chemical properties (In Chinese). Zhejiang Agricultural Science, 1997, 3:118~120
- [6] 李德成, Velde B, Delerue J F, 等. 免耕制度下耕作土壤结构演化的数字图像分析. 土壤学报, 2003, 39(2):214~220. Li D C, Velde B, Delerue J F, et al. Image analyses of development of cultivated soil structures under non-tillage systems (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2003, 39(2):214~220
- [7] 刘世平,庄恒扬,陆建飞,等. 免耕法对土壤结构影响的研究. 土壤学报, 1998, 35(1):33~37. Liu S P, Zhuang H Y, Lu J F, et al. Influence of no-tillage on soil structure (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 1998, 35(1):33~37
- [8] 张志国,徐琪. 长期秸秆覆盖免耕对土壤某些理化性质及玉米产量的影响. 土壤学报, 1998, 35(3):384~391. Zhang Z G, Xu Q. Influences of long-term mulched no-tillage treatment on some soil physical and chemical properties and corn yields (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 1998, 35(3):384~391
- [9] 徐阳春,沈其荣,冉炜. 长期免耕与施用有机肥对土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响. 土壤学报, 2002, 39(1):89~96. Xu Y C, Shen Q R, Ran W. Influence of no-tillage on soil structure effects of zero-tillage and application of manure on soil microbial biomass C, N, and P after sixteen years of cropping (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2002, 39(1):89~96
- [10] Collins H P, Rasmussen P E, Douglas C L J. Crop rotation and residue management effects on soil carbon and microbial dynamics. Soil Sci. Soc. Am. J. 1992, 56:783~788
- [11] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法. 北京:中国农业科技出版社, 2000. 12~183. Lu R K. ed. Analytical Methods of Soil and Agricultural Chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. 2000. 12~183
- [12] 许光辉,郑洪元主编. 土壤微生物分析方法手册. 上海:上海科学技术出版社, 1986. 205~209. Xu G H, Zheng H Y. eds. Analytical Methods Manual of Soil Microorganisms (In Chinese). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1986. 205~209
- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第三版). 北京:科学出版社, 2002. 1595~1604. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed. In Chinese). Beijing: Science Press, 2002. 1595~1604
- [14] 黄婷婷,曹慧,王兴祥. 一种土壤微生物总 DNA 的高效提取方法. 土壤, 2004, 36(6):662~666. Huang T T, Cao H, Wang X X. An Efficient method for DNA extraction from soil microorganism

- (In Chinese). *Soils*, 2004, 36(6): 662 ~ 666
- [15] 夏北成, Zhou J, Tiedje J M. 土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征. *生态学报*, 2001, 21: 574 ~ 578. Xia B C, Zhou J, Tiedje J M. Structures of bacteria cloning communities in the soil environment and their ecological characteristics (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21: 574 ~ 578
- [16] 戈峰. 现代生态学. 北京: 科学出版社, 2002. 251 ~ 254. Ge F. *Modern Ecology* (In Chinese). Beijing: Science Press, 2002. 251 ~ 254
- [17] God IL. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 1953, 40: 237 ~ 264
- [18] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: What 16S rDNA libraries can tell us. *Fems Microbiology Ecology*, 2004, 47: 161 ~ 177
- [19] Qiu X Y, Wu L X, Huang H S. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 880 ~ 887

## DIVERSITY AND SPATIAL DISTRIBUTION OF BACTERIA IN NON-TILLAGE PADDY FIELDS

Wang Ying<sup>1,2</sup> Teng Qihui<sup>1</sup> Cui Zhongli<sup>1</sup> Sun Bo<sup>3</sup> Cao Hui<sup>1†</sup> Hu Feng<sup>2</sup>

(1 *Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

(2 *College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

(3 *Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*)

**Abstract** Diversity and its spatial distribution of bacteria in 0 ~ 5 cm, 5 ~ 10 cm and 10 ~ 15 cm depths of non-tillage paddy fields were studied based on the molecular method of ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis). Results indicated that in different soil layers of the paddy field, bacteria were very high in species diversity, which, however, varied from layer to layer due to differences in soil moisture, soil depth, soil temperature, daylight and some other factors. Bacteria in the surface layer were the highest in species diversity, but without a dominant genotype. They were relatively low in species diversity in the 10 ~ 15 cm soil layer, but they did have some dominant genotype. Bacteria communities in different soil layers showed little similarity. The Jaccard index was 20.65% between the bacterial clones libraries of the 0 ~ 5 cm and 5 ~ 10 cm soil layers; only 8.31% between those of the 0 ~ 5 cm and 10 ~ 15 cm soil layers and 38.75% between those of the 5 ~ 10 cm and 10 ~ 15 cm soil layers, indicating complexity of the structures of soil bacteria communities and spatial segregation in the soil.

**Key words** ARDRA; RFLP; Paddy soil; Bacteria community; Microbial species diversity; Spatial distribution; Non-tillage